

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 février 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/016563 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68,
A61K 31/708, 31/519, 31/437, A61P 25/28, 9/10, 37/00

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker
et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02861

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 13 août 2002 (13.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/10819 14 août 2001 (14.08.2001) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continua-
tion partielle (CIP) à une demande antérieure :
US 09/983,754 (CIP)
Déposée le Non communiquée

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : EX-
ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel,
F-75017 Paris (FR).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement*

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : AÏT
IKHLEF, Ali [FR/FR]; 1, rue de l'Eglise, 91940 Gometz
Le Châtel (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue
Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFFER,
Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300
Vincennes (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: NOVEL MOLECULAR TARGET FOR NEUROTOXICITY

(54) Titre : NOUVELLE CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

(57) Abstract: The invention relates to the field of biology, genetics and medicine and to novel methods of detecting, characterising and/or treating (or managing) neurodegenerative pathologies, particularly amyotrophic lateral sclerosis. Said invention also relates to methods of identifying or screening active compounds in said pathologies. Moreover, the invention relates to compounds, genes, cells, plasmids or compositions that can be used to carry out the above-mentioned methods. In particular, the invention outlines the role of PDE4B in said pathologies and the use thereof as a therapeutic, diagnostic or experimental target.

(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de PDE4B dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/016563 A2

Nouvelle Cible Moléculaire de la Neurotoxicité

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la
5 détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou
10 compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiesterase 4B dans ces pathologies et décrit son utilisation comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

15 De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques et de la chorée de Huntington.

20 La sclérose amyotrophique latérale (SAL ou ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) est une maladie neurodégénérative associée à différents types d'inclusions tels les corps de Lewis et caractérisée par une apoptose des motoneurones spinaux et corticaux dont l'issue fatale est parfois associée à une démence frontale. Des formes sporadiques, sans aucune mutation décrite,
25 coexistent avec des formes familiales (FALS) associées à des mutations dans le gène SOD1 codant pour la superoxyde dismutase. La majorité des cas est sporadique, les formes familiales (FALS) étant très rares. Il est vraisemblable qu'une longue période asymptomatique précède l'apparition des symptômes cliniques qui sont variés et dont la classification est complexe. Les futurs
30 développements thérapeutiques substitueront aux traitements de la symptomatologie des stratégies basées sur les causes moléculaires de la pathologie. Au niveau cellulaire, ces symptômes sont associés à une mort des

motoneurones corticaux et des motoneurones spinaux. Cette mort neuronale a été reliée à différents phénomènes qui constituent la base de plusieurs pathologies neurodégénératives. C'est le cas de l'excitotoxicité liée au glutamate, du stress oxydatif, d'une certaine auto immunité dirigée contre des marqueurs neuronaux (les canaux calciques dans le cas de l'ALS) ainsi que d'anomalies du cytosquelette. Si ces phénomènes sont décrits, la ou les causes de ces maladies, dont l'ALS, sont obscures. Même si les FALS sont liées à des mutations dans le gène SOD1 qui code pour la superoxyde dismutase, les mécanismes qui engagent les neurones vers la mort cellulaire dont au moins une composante est l'apoptose, sont inconnus.

L'identification des événements moléculaires impliqués dans les différents phénomènes impliqués dans la mort cellulaire permettra de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'étude de ces événements est difficilement réalisable à partir de biopsies humaines. Ces biopsies proviennent évidemment d'échantillons post-mortem dont la qualité est difficilement contrôlable et ne représentent que des états pathologiques représentatifs des phases tardives de la maladie.

Les modèles animaux donnent accès à des échantillons biologiques qui permettent d'analyser différentes étapes du développement d'une pathologie et de comparer ces étapes à des témoins sains. A cet égard, des souris transgéniques qui expriment le gène humain SOD1 portant l'une des mutations qui prévaut dans les FALS (mutation G93A) sont disponibles auprès de Jackson Laboratory, sous condition de prise d'une licence d'utilisation auprès de la NorthWestern University. Ce modèle reproduit en 120 jours l'issue fatale de la maladie avec des symptômes comparables à ceux de la maladie humaine. L'apparition des symptômes d'ALS liés à la mutation G93A dans SOD1 n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité superoxyde dismutase mais d'un gain de fonction qui augmente la capacité de l'enzyme à générer des radicaux libres. Malgré ces informations, les événements moléculaires qui président aux différentes étapes de l'ALS sont mal connus. La complexité de

ces évènements moléculaires reflète l'évolution de la pathologie : Dans le modèle transgénique étudié, aucune dérégulation neuronale ou manifestation clinique n'a été rapportée à 30 jours. 60 jours correspondent à un stade qui précède de peu les premiers symptômes, mais qui est déjà caractérisé au
5 niveau cérébral par des changements dans la physiologie cellulaire tels qu'une altération du métabolisme mitochondrial, un stress et une mort neuronale associés à un phénomène d'excitotoxicité. A 90 jours, 50% des motoneurones corticaux et spinaux sont morts et un processus actif d'apoptose neuronale est engagé parallèlement à une activation astrocytaire. Le phénomène
10 d'excitotoxicité n'est plus observé à ce stade. La mort neuronale y est associée à l'activation de caspases qui ne semblent pas impliquées dans les phases précoces de la pathologie.

Identifier les différents évènements moléculaires spécifiques des différentes
15 phases de la pathologie doit permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien que de nouveaux marqueurs diagnostiques. L'une des approches les plus efficaces pour réaliser cette identification consiste à identifier les gènes et les protéines dont l'expression caractérise un état physiopathologique.

20 La présente invention décrit à présent l'identification d'événements génétiques impliqués dans les phénomène d'excitotoxicité et de mort neuronale. La présente invention fournit ainsi de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques des pathologies associées à ces phénomènes, ainsi que de
25 nouvelles cibles pour l'identification de composés actifs.

Plus particulièrement, une analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum
30 d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Cette analyse a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la

technique DATAS (décrite dans la demande n° WO99/46403), qui présente des avantages inégalés.

La présente demande de brevet découle notamment de la construction par la
5 demanderesse d'un répertoire des altérations d'épissage dans le cerveau des
animaux modèles de l'ALS âgés de 60 jours. Ce répertoire, qui contient plus de
200 séquences distinctes, implique des acteurs clefs du phénomène
d'excitotoxicité tels que les canaux potassiques et le récepteur NMDA. Des
séquences dérivées d'ARNs codant pour des protéines impliquées dans la
10 réponse au stress, dont des protéines de choc thermique, font également partie
de ce répertoire, soulignant l'implication de cette réponse dans les phases
précoces de l'ALS. Une altération du métabolisme énergétique apparaît
clairement affecter les motoneurones corticaux des animaux qui développent la
pathologie. Par exemple, l'intron 6 de la forme mitochondriale de la créatine
15 kinase est isolé spécifiquement à partir des ARN messagers exprimés en
conditions pathologiques chez les animaux âgés de 60 jours. Cette interruption
de la séquence codante par cette rétention d'intron aboutit à un ARN messenger
qui code pour une forme inactive de l'enzyme. Cette observation est en accord
avec les observations biochimiques qui ont montré une diminution de l'activité
20 créatine kinase mitochondriale corrélée avec une diminution de la quantité de
cette enzyme dans les neurones des animaux du même modèle transgénique.
La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée par le fait
que la même analyse différentielle qualitative de l'expression génétique réalisée
sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire différent dont sont
25 absents notamment les différents marqueurs de l'excitotoxicité. L'analyse des
modifications d'épissage confirme que les événements moléculaires sont
différents selon le stade de la pathologie.

De manière particulièrement intéressante et inattendue, la réalisation de DATAS
30 sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis
d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce
fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les

animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1) (séquence également accessible dans GenBank, n°AF208023).

5 Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs. Cette expression différentielle a été
10 mise en évidence par des expériences de RT PCR présentées sur les figures 1A et 1B.

La présente demande démontre donc l'implication de la phosphodiesterase 4B dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale. Les
15 résultats obtenus montrent une expression plus prononcée de PDE4B dans les tissus nerveux pathologiques, liée à une modification structurale de l'ARN correspondant, notamment à la délétion d'une région dans la partie 3' non-codante. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS. Leur
20 délétion de l'ARNm de la PDE4B, par épissage ou par utilisation de séquences de polyadénylation alternatives, peut aboutir à une stabilisation, donc à une augmentation de l'expression de la partie codante de cet ARN. Cet événement se produit spécifiquement dans le cerveau des sujets pathologiques et non dans les sujets contrôles.

25 La présente invention décrit donc un événement moléculaire original qui aboutit à une augmentation de l'expression de l'ARNm de la PDE4B dans le cerveau des sujets pathologiques et qui est corrélé dans le temps avec le phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. L'invention montre également, pour la première fois, qu'une augmentation de l'expression de la PDE4B est associée
30 aux stades précoces de l'ALS. La PDE4B constitue donc une cible thérapeutique nouvelle et importante dans le développement de thérapeutiques de ces pathologies, utilisables notamment à des phases précoces de leur

développement, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes inflammatoires associées. L'invention décrit également de nouvelles méthodes de diagnostic, dépistage, détection, détermination d'une prédisposition ou de suivi de l'évolution ou de l'efficacité du traitement de ces pathologies.

Détection, Diagnostic et dépistage

Un objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure in vitro de l'expression de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B dans un échantillon provenant du sujet. La méthode comprend avantageusement une mesure de l'expression différentielle de la région 3' non-codante du gène PDE4B et du reste du gène, notamment de la partie codante.

Un autre objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de la PDE4B pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messager de la PDE4B, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort

neuronale, etc. Plus généralement, l'invention repose sur une méthode de diagnostic, dépistage, caractérisation ou suivi d'une pathologie dégénérative, comprenant la mise en évidence d'une altération dans le gène PDE4 ou dans l'ARN correspondant, typiquement PDE4B.

5

L'expression de la PDE4, ou le différentiel d'expression, ou la présence d'une forme altérée peuvent être déterminés par des techniques conventionnelles de biologie moléculaire, comme par exemple par séquençage, hybridation, amplification, RT-PCR, migration sur gel, etc. L'invention est applicable au diagnostic ou la détection de différentes pathologies impliquant les phénomènes d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, l'ALS, la chorée de Huntington ou l'ischémie cérébrale. Elle peut être utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de la pathologie, etc. Elle est particulièrement adaptée à la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques ou de l'ALS.

Pour la mise en œuvre des méthodes génétiques de diagnostic ou de détection selon l'invention, on utilise plus particulièrement des acides nucléiques capables de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de la PDE4B, notamment une forme dépourvue de tout ou partie de la région 3' non codante. A titre d'exemple spécifique, on utilise un acide nucléique complémentaire de tout ou partie de la région comprise entre les résidus 2760 à 2869 de la séquence SEQ ID NO :1, ou des résidus correspondants de la séquence du gène ou de l'ARNm de la PDE4B humaine. La séquence de l'ADNc codant la PDE4B humaine et de la protéine correspondante sont représentées dans les séquences SEQ ID NO : 3 et 4 (voir également Genbank, n° NM_002600). La région 3' non-codante de l'ARN ou du gène PDE4B humain correspond aux résidus 2461 à 4068 de SEQ ID NO :3.

30

Avantageusement, l'acide nucléique utilisé (comme sonde) comprend tout ou partie de la séquence codant la région 3' non-codante du gène ou de l'ARN de

la PDE4B comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou une séquence complémentaire de celles-ci.

- 5 Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :
- résidus 2384 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2500 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2760 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - 10 - résidus 2780 à 2850 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2790 à 2810 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2600 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3000 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3500 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - 15 - résidus 3900 à 4040 de SEQ ID n° 3.

Selon un autre mode particulier, on utilise un acide nucléique complémentaire de la séquence de la région de l'ARN de PDE4 résultant de la délétion de tout ou partie de la partie 3' non codante. L'élimination d'un domaine crée en effet de nouvelles jonctions dans la séquence, qui sont spécifiques de la forme délétée et peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence d'une telle forme dans un échantillon.

La complémentarité entre la sonde et la séquence cible est, de préférence, parfaite pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantageusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence 3'-non codante de la

PDE4B. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive, enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Une autre approche pour détecter la présence d'une altération du gène PDE4
5 utilise une amorce ou un couple d'amorces nucléiques permettant une
amplification sélective d'une portion de l'ARN PDE4, de préférence comprenant
une portion de la région 3' non codante. On utilise typiquement une amorce
permettant l'amplification sélective de la forme altérée de l'ARN de PDE4,
notamment d'une amorce spécifique de la jonction créée par l'élimination du
10 partie de la région 3' de l'ARN.

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire
d'une partie de la région 3' non-codante de la PDE4B, et permettant
l'amplification d'une partie de cette région. L'amorce comporte
15 avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est préférentiellement composée d'un
fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence comprise entre les
nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides
2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou d'une séquence complémentaire
de celles-ci. Un autre objet de l'invention réside dans un couple d'amorce
20 permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-
codante de la PDE4, le dit couple comprenant au moins une amorce telle que
définie ci-dessus.

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact in
25 vitro un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un
acide nucléique (sonde, amorce, etc.) tel que défini ci-dessus, et on détecte la
formation d'un hybride ou d'un produit d'amplification. L'échantillon biologique
peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide
nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.

30

Le procédé de détection, dépistage ou diagnostic peut être mis en œuvre à
partir de différents types d'échantillons provenant d'un sujet, comme par

exemple des biopsies de tissus, notamment de tissu nerveux. De manière particulièrement surprenante et avantageuse, la présente invention montre par ailleurs que la dérégulation de l'expression de PDE4, corrélée au phénomène d'excitotoxicité, peut être mise en évidence directement dans le tissu musculaire. Ceci est tout particulièrement remarquable dans le cas de pathologies neurodégénératives telles que l'ALS.

Au cours du développement de l'ALS, les phénomènes dégénératifs se produisent non seulement dans le cerveau mais également dans la moelle épinière et en conséquence dans le muscle par défaut d'innervation. La figure 2 présente les modifications d'expression de l'ARNm de la PDE4B dans les muscles de souris contrôles et transgéniques, suivies en utilisant les mêmes amorces de PCR que lors de l'étude sur les ARN de cerveaux de ces mêmes animaux. De façon analogue, toutefois moins prononcée, une diminution de l'expression de la région 3' non codante de la PDE4B, et non du reste de cet ARNm (notamment la partie codante), est observée spécifiquement dans le muscle des animaux en fin de phase pré-symptomatique, c'est à dire âgés de 90 jours.

L'une des difficultés rencontrées lors des études et des traitements de l'ALS est la difficulté de poser un diagnostic précoce. Cette observation de dérégulation de l'ARNm de la PDE4B dans le muscle ALS permet de proposer un diagnostic précoce à partir de biopsies musculaires de patients. Ce diagnostic est basé sur la détection de l'expression différentielle de la région 3' non codante et du reste de la séquence, notamment codante, de la PDE4B.

Un procédé particulier de détection d'une situation de stress neuronal, notamment d'excitotoxicité, en particulier liée à une pathologie neurodégénérative chez un sujet, comprend la mesure de l'expression du gène PDE4B, ou de la présence de formes délétées du messenger de PDE4B, dans un échantillon de cellules musculaires provenant dudit sujet.

Pour mesurer l'expression différentielle, on utilise par exemple une sonde correspondant à (c'est-à-dire spécifique de) une partie de la région 3' non codante et une sonde correspondant à une partie de la région codante de la PDE4B. Le signal détecté avec chacune de ces sondes permet d'évaluer le différentiel d'expression. Une autre approche utilise deux couples d'amorces permettant une amplification d'une portion de la région 3' non codante d'une part et d'une partie de la région codante d'autre part.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région 3' non-codante et une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région codante.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4 et un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région codante de la PDE4.

Thérapie

Les phosphodiésterases hydrolysent les acides nucléiques cycliques tels l'AMPc et le GMPc, régulant différentes cascades de signalisation. La PDE4B hydrolyse l'AMPc, régulant ainsi la concentration intracellulaire de ce second messager. L'implication de l'AMPc dans la balance qui existe entre la viabilité cellulaire et l'apoptose est bien décrite dans la littérature. Notamment, la cascade AMPc est bien intégrée dans les cascades de survie cellulaire impliquant des kinases telles Akt et PI3K, de même que dans la régulation de l'activité du facteur de transcription CREB. Il est à noter que ce facteur de transcription est impliqué dans la survie neuronale et la croissance des neurites. Toutefois, l'utilisation

- d'inhibiteurs de PDE et avantageusement de PDE4 n'a jamais été envisagée pour améliorer la viabilité neuronale et plus particulièrement leur protection contre l'excitotoxicité. Les inhibiteurs de PDE4, développés pour inhiber les phénomènes inflammatoires, ont été suggérés comme potentiellement utiles dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Cette suggestion s'appuie sur la volonté de réduire les inflammations qui sont observées dans le cerveau au cours des processus neurodégénératifs et nullement sur un rationnel visant à inhiber directement la mort neuronale.
- 10 La présente invention montre l'existence d'événements d'épissage ou de sites de polyadénylation alternatifs affectant le gène de la PDE4, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et fournit la base moléculaire qui justifie l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 pour le traitement de l'ALS et plus généralement pour améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes d'excitotoxicité, en particulier dès les phases précoces de ces pathologies.
- 15

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé capable d'inhiber ou de réduire l'expression ou l'activité de la PDE4B, pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives, notamment en phase précoce, plus préférentiellement pour réduire l'excitotoxicité neuronale précoce associée aux maladies neurodégénératives telles l'ALS, Alzheimer ou Parkinson.

20

Un objet particulier réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de PDE4 pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité chez les sujets atteints d'ALS ou pour augmenter la survie neuronale chez les sujets atteints d'ALS.

25

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé capable d'inhiber (de préférence de manière sélective) l'expression ou l'activité de la PDE4B de séquence SEQ ID n° 2 ou 4 pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale.

30

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie associée à un stress neuronal, notamment à une excitotoxicité, comprenant l'administration à un sujet d'un composé inhibiteur de l'activité ou de l'expression de la PDE4B, de préférence un composé inhibiteur sélectif de PDE4.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement de l'ALS, notamment dans une méthode pour augmenter la survie des neurones chez des patients atteints d'ALS, comprenant l'administration à un sujet d'un inhibiteur de PDE4, de préférence un composé inhibiteur sélectif de PDE4.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

Le composé utilisé peut être tout composé capable d'inhiber l'expression de la PDE4, notamment la PDE4B, c'est-à-dire en particulier tout composé inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, etc. Il peut s'agir d'un composé inhibant la modification de l'ARN, notamment la délétion d'une partie de la région 3' non-codante.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messenger correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut comprendre tout ou partie de la séquence du gène de la PDE4B, d'un fragment de celle-ci, du messenger de la PDE4B, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région complémentaire de la

séquence comprise entre les résidus 218-2383 de SEQ ID NO :1 ou 766-2460 de SEQ ID NO :3, et inhiber (ou réduire) sa traduction en protéine. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être simple-brin ou double-brin. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. S'agissant d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

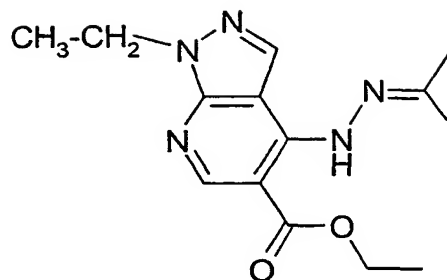
Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide, par exemple comprenant une région de la protéine PDE4 (notamment PDE4B) et capable d'antagoniser son activité.

Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité de la PDE4B.

Dans une variante préférée, on utilise un composé de synthèse, inhibiteur de PDE4. Différents types d'inhibiteurs peuvent être mis en oeuvre. Il s'agit préférentiellement de composés de la famille des pyrazolopyridines, parmi lesquels figure notamment l'étazolate, ou de composés de la famille des dérivés de xanthine (ou 2,6-dioxopurine), parmi lesquels figure notamment la pentoxifylline.

Les composés de la famille des pyrazolopyridines sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

L'étazolate de formule suivante :



Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-
b]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),

Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-éthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-
carboxylique

1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-*D*-1-deoxy-ribofuranose

Ester éthylique de l'acide 1-éthyl-4-(*N'*-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-
pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),

4-amino-6-méthyl-1-*n*-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-éthyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-
5-carboxylique (desbutyl tracacolate),

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

Ester éthylique de l'acide 1-éthyl-6-méthyl-4-méthylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-
b]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-
5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 1-éthyl-4-éthylamino-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-
b]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-
5-carboxylique,

5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-3-ol,

ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-
carboxylique,

acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-éthyl-3,6-diméthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-
b]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-diméthylamino-1-éthyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5 ester éthylique de l'acide 1-éthyl-6-méthyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

10 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

15 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,

4-amino-1-pentyl-*N*-*n*-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

20 ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

25 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide

ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

30 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-*N*-(2-propenyl)carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

45 ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5 ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

10 ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,

15 ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,

ester prop-2-ynylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

20 ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

25 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,

30 ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),

35 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,

40 ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45 ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
5 ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
10 ester 2-cyclopropyl-éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
15 ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
20 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
25 ester benzylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,
1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
30 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,
2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,
40 3-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,
ester propylique de l'acide 3-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,
45 ester éthylique de l'acide 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,

ester éthylique de l'acide 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-
pentanoïque,

5 ester éthylique de l'acide 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-
benzoïque,

ester propylique de l'acide 3-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-
pentanoïque,

10 *N*-benzylidene-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

N-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-
hydrazine,

15 *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-
hydrazine,

N-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-
hydrazine,

20 *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-
yl)-hydrazine,

25 4-[(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonométhyl]-
benzonitrile,

N-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-
b]pyridin-4-yl)-hydrazine,

30 *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-
hydrazine,

N-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-
hydrazine,

35 *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluorométhyl-
benzylidene)-hydrazine,

40 *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-
ylmethylene)-hydrazine,

N-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluorométhyl-
benzylidene)-hydrazine,

45 *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-
benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,

Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,

ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

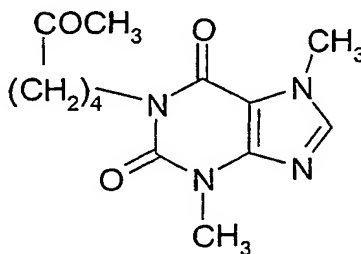
ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Parmi les dérivés de xanthine, on utilise en particulier (i) les (ω -1)-hydroxyalkyl-dialkylxanthine où le groupe (ω -1)-hydroxyalkyle contient 5 ou 6 atomes de carbone et est en position 1 ou 7, le groupe alkyle sur l'autre position 7 ou 1 contient de 1 à 12 atomes de carbone et le groupe alkyle en position 3 contient de 1 à 4 atomes de carbone, (ii) les (ω -1)-oxoalkyl-diméthylxanthine où le groupe (ω -1)-oxoalkyle contient 5 ou 6 atomes de carbone et est en position 1

ou 7, ou (iii) les dérivés de diméthylxanthine ayant un groupe alkyle contenant de 4 à 12 atomes de carbone ou un groupe benzyle en position 1 ou 7.

Typiquement, les oxoalkyl-dialkylxanthines incluent par exemple les 1-(5-oxohexyl)-3,7- and 7-(5-oxohexyl)-1,3-diméthylxanthines. D'autres xanthines peuvent être également utilisées telles que notamment les 3,7-diméthylxanthines et 1,3-diméthylxanthines substituées par un groupe butyle, isoamyle, hexyle, lauryle ou benzyle en position 1 ou 7, ainsi que les homologues de ces composés avec un groupe hydroxy ou oxo en position (ω -1)-position, ex. les 1-(4-hydroxypentyl)- et 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-diméthylxanthines, 7-(4-hydroxypentyl)- et 7-(5-hydroxyhexyl)-1,3-diméthylxanthines, 1-(4-oxopentyl)-, 1-(5-oxohexyl)-, 1-(2-méthyl-3-oxobutyl)- et 1-(2-éthyl-3-oxobutyl)-3,7-diméthylxanthines et les composés 1,3-diméthyl correspondant présentant le groupe (ω -1)-hydroxyalkyl ou (ω -1)-oxoalkyl en position 7. Des homologues des hydroxyalkyl-diméthylxanthines mentionnés ci-dessus, sont ceux présentant en position 1 ou 7 qui n'est pas occupée par un groupe hydroxyalkyle, au lieu d'un groupe méthyle, un groupe alkyle ayant de 2 à 12 atomes de carbone, tel que 1-éthyl-, 1-propyl-, 1-butyl- et 1-isobutyl-3-méthyl-7-(5-hydroxyhexyl)-xanthines et 7-éthyl-, 7-propyl-, 7-butyl- et 7-isobutyl-1-(5-hydroxyhexyl)-3-méthylxanthines, et les composés correspondants présentant à la place du radical méthyl en position un groupe alkyle de 2 à 4 atomes de carbone, tel que notamment un radical éthyl, n-propyle, isopropyle, isobutyle ou n-butyle.

Parmi ces dérivés de xanthine, on utilise en particulier la pentoxifylline de formule suivante :



La présente invention propose donc, pour la première fois, la PDE4B comme cible thérapeutique pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives. Elle est applicable notamment au traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de l'ALS, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.

D'autres objets de l'invention résident dans :

10 . l'utilisation des composés indiqués ci-dessus, en particulier de l'étazolate ou de la pentoxifylline, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS, ou

15 . l'utilisation des composés indiqués ci-dessus, en particulier de la pentoxifylline ou de l'étazolate, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la PDE4B chez les patients atteints d'ALS.

L'invention concerne également des méthodes de traitement de l'ALS comprenant l'administration d'un composé inhibant sélectivement l'expression ou l'activité de la PDE4B de séquence SEQ ID n° 2 ou 4. De préférence, les méthodes de l'invention sont utilisées pour le traitement en phase précoce des maladies neurodégénératives.

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. L'administration par voie orale est préférée. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Pour des composés nucléiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg et 100 mg par dose. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout

véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain.

- 5 Les résultats présentés dans les exemples illustrent l'efficacité d'inhibiteurs de PDE4B pour améliorer la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité.

10 Méthodes de sélection et outils

- D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, comprenant la mise en
- 15 contact de composés tests avec une cellule exprimant la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant), et la mise en évidence des composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.

- Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations
- 20 cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement la PDE4B, transfectées avec un acide nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules eucaryotes inférieures
- 25 (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

- Les méthodes de screening peuvent également être réalisées en système acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier la PDE4B ou un variant ou fragment de celle-ci.

30

Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules

recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent
5 avantageusement un gène de sélection et/ou une origine de réplication et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemples des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réplication, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte
10 compétent, comme par exemple des cellules prokaryotes ou eukaryotes. Il peut s'agir de bactéries (par exemple E. coli), levures (par exemple Saccharomyces ou Kluyveromyces), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

15 D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1: PCR semi-quantitative de PDE4B à partir d'échantillons de cerveau (1A) et de muscle (1B).

Figure 2: La pentoxifylline protège les neurones primaires de granules
25 cérébelleux de l'excitotoxicité induite par le kainate.

Figure 3: La pentoxifylline protège les neurones primaires de granules cérébelleux de l'excitotoxicité induite par NMDA/serine.

Figure 4: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

30 Figure 5: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 6: Effet neuroprotecteur de la pentoxifylline sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 7: Effet neuroprotecteur de la pentoxifylline sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

5 Figure 8: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 9: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

10 Figure 10: Effet neuroprotecteur du 8-bromo-cAMP sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 11: Effet neuroprotecteur du 8-bromo-cAMP sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

EXEMPLES

15

Exemple 1 : Identification de la PDE4 comme cible moléculaire de l'excitotoxicité

20 L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

25 Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément
30 pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent des banques qualitatives différentielles. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les événements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS
5 correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces évènements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

- 10 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classer les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques
15 âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop
20 de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1). Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs.

25

Exemple 2 : Expériences de RT-PCR : Confirmation de l'expression différentielle :

L'expression différentielle de la PDE4B dans une situation de stress neuronal,
30 par rapport à une situation de référence, a été vérifiée par des expériences de RT PCR présentées sur la figure 1.

Ces expériences ont été réalisées selon des techniques bien connues de l'homme de métier et ont permis de suivre les expressions de deux régions distinctes de l'ARNm de la PDE4B. Une de ces régions recouvre le codon d'initiation de cet ARNm (PDE4B 5'), l'autre recouvre en partie le fragment
5 identifié selon la technique DATAS (PDE4B DATAS). Les localisations des amorces de PCR utilisées sont indiquées sur la figure 1.

L'ARN PO correspond à un ARN ribosomal utilisé comme contrôle interne destiné à vérifier que la même quantité d'ARN est utilisée pour chaque point expérimental. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'animaux
10 contrôles (C) et transgéniques (T) âgés de 30, 60 et 90 jours, c'est à dire avant l'apparition des symptômes pathologiques.

Les ARN totaux du cerveau des souris contrôle ou SOD1 G93A âgées 30, 60 et 90 jours sont transcrits en ADNc utilisant le protocole standard de SuperscriptTM (Invitrogen). Pour les PCR semi-quantitatives les produits de la réaction de
15 reverse transcription sont dilués 10 fois. Les amorces spécifiques du fragment DATAS correspondent pour le sens aux nucléotides 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3' ; SEQ ID NO : 5), et pour l'anti-sens aux 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3' ; SEQ ID NO : 6) et pour le fragment plus en 3 prime les amorces correspondent pour le sens aux nucléotides 145-165 (5'
20 CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3' ; SEQ ID NO : 7), et pour l'anti-sens aux 426-404 (5' CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3' ; SEQ ID NO : 8). Comme gène de référence le gène P0 est utilisé et amplifié par les amorces, sens : 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEQ ID NO : 9) et anti-sens : CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEQ ID NO : 10).

25 L'amplification est effectuée par 30 cycles de PCR suivants :

- 30 secondes à 94°C
- une minute à 57°C
- 30 secondes à 72°C, suivi par un cycle de 2 minutes à 72°C

Les différents produits de PCR sont mis sur un gel d'agarose de 1.5 %.

30 L'expérience est répétée trois fois avec deux réactions de reverse transcription différentes.

La figure 1 présente les résultats obtenus à partir d'ARN extraits des cerveaux ou des muscles des animaux.

Alors que la même quantité d'ADNc est amplifiée à partir de l'ARN de PO dans tous les échantillons, de variations sont observées pour l'ARNm de la PDE4B :
5 les variations les plus significatives sont détectées chez les animaux âgés de 90 jours : alors qu'une augmentation du niveau d'expression du fragment PDE4 5' est observée dans le cerveau des animaux transgéniques, une très forte diminution de l'expression de PDE4B (DATAS) est observée dans le cerveau des animaux transgéniques.

10 Ce résultat établit une corrélation entre la diminution de l'expression d'un fragment 3' non codant de l'ARNm de la PDE4B et l'augmentation de l'expression de la partie 5' codante de ce même messenger. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS et démontre la corrélation entre
15 l'expression de PDE4B et le phénomène d'excitotoxicité.

Exemple 3 : Inhibition de l'excitotoxicité par des inhibiteurs de PDE4

Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet de rat ainsi que des
20 neurones corticaux ont été mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier.

Culture primaire des cellules granulaires de cervelet :

Les rats Wistar âgés de sept jours sont décapités et leurs cervelets sont
25 disséqués. Après avoir enlevé les méninges, le tissu est coupé en petits morceaux et trypsinisé pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées par trituration et mises en cultures à une densité 300.000 cellules par cm² dans du milieu basal Eagle supplémenté avec 10% du sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine. Le lendemain 10 µM ARA-C, un anti-mitotique, est ajouté pour
30 empêcher la prolifération des cellules gliales. Les cellules sont traitées le jour 9 de cultures avec les phosphodiesterase inhibiteurs, pentoxifylline et étazolate, trois heures avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 100 µM N-methyl-D-

aspartate en présence de 10 μ M D-sérine. Le 8-bromo-cAMP est ajouté juste avant les toxiques. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

Cultures primaires des cellules corticales :

Des embryons de rat Wistar, âgés de 16 jours, sont prélevés et les cortex sont disséqués. Après la trypsination à 37°C pendant 25 minutes, les cellules sont dissociées par trituration. Les cellules sont ensemencées dans du milieu essentiel minimum, supplémenté avec 10% de sérum de cheval et 10% de sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine, à une densité de 300.000 cellules par cm^2 . Après 4 jours en culture la moitié du milieu est changée avec du milieu essentiel minimum supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 2 mM glutamine. Le même jour, 10 μ M de 5-fluoro-2-deoxyuridine, un anti-mitotique, est ajouté. Après sept et onze jours de culture, la moitié du milieu est changée par du milieu conditionné. Le milieu conditionné est composé de MEM contenant 5 % de sérum de cheval et 2 mM glutamine ; ce milieu est passé sur un tapis d'astrocytes corticales pendant une nuit avant son utilisation. A jour 14, les cellules sont traitées avec les phosphodiesterase inhibiteurs, pentoxifylline et étafolate, une heure avant l'addition des toxiques, 50 μ M kainate ou 20 μ M N-méthyl-D-aspartate en présence de 10 μ M D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml par puits.

Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le milieu est aspiré et les cristaux sont resuspendus dans 500 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

5

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 2-10. Ces résultats illustrent l'effet protecteur des composés de l'invention sur la survie neuronale. Lors du co-traitement des neurones par un inhibiteur de PDE4, un effet protecteur dose-dépendant est observé dans les deux modes d'induction de l'excitotoxicité (NMDA/Serine et kainate). Un tel effet protecteur est observé à l'aide de la pentoxifylline et de l'étazolate.

15 Les figures 2 et 3 présentent des résultats obtenus à l'aide de la pentoxifylline sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que la pentoxifylline permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 43% dans le cas du traitement NMDA/serine, et de 33% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

20

Les figures 4 et 5 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 60% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 57% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

25

Les figures 6 et 7 présentent des résultats obtenus à l'aide de la pentoxifylline sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que la pentoxifylline permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 50% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 66% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

30

Les figures 8 et 9 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 33% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 25% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

5

La pertinence de ces protections est attestée par les % de protection obtenus par des concentrations croissantes d'AMPC, substrat des PDE, donnés à titre d'exemple pour les cellules granulaires du cervelet sur les figures 10 et 11. Ces % sont de 40% pour le traitement NMDA/serine et de 40% pour le traitement kainate.

10

La présente invention documente donc non seulement l'implication de la PDE4B dans les mécanismes d'excitotoxicité, notamment dans un modèle d'ALS, mais également la capacité d'inhibiteurs de PDE4 à préserver la viabilité neuronale lors de stress liés à l'excitotoxicité.

15

Exemple 4 : Utilisation clinique chez l'homme

Cet exemple décrit les conditions d'une utilisation en clinique humaine d'un inhibiteur de PDE4, dans le traitement de l'ALS. Cet exemple illustre le potentiel thérapeutique de l'invention et ses conditions d'application à l'être humain.

20

Dans cet essai clinique, le traitement est basé sur une combinaison de pentoxifylline et de riluzole. La dose de pentoxifylline utilisée est de 400 mg par administration, sous forme de trois prises quotidiennes, soit une dose quotidienne totale de 1200 mg. La pentoxifylline est utilisée sous forme de comprimés. L'essai est multi-centrique et réalisé en double-aveugle contre placebo sur 400 patients. Les patients inclus dans l'essai sont des hommes ou des femmes âgés de 18 à 80 ans, atteints d'ALS sporadique ou familiale, et sous traitement par le riluzole (50 mg b.i.d.) depuis 3 mois au moins. Le traitement à la pentoxifylline est prévu sur une durée de 18 mois.

30

L'efficacité est mesurée principalement par le taux de survie des patients, la qualité de vie, des tests musculaires.

D'autres aspects et applications de l'invention résident dans :

5

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messenger de la PDE4B à des fins de diagnostic ou de dépistage ou de caractérisation de pathologies neurodégénératives ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de

10

Parkinson, la sclérose en plaques, la chorée de Huntington, l'ALS ou l'ischémie cérébrale,
- l'utilisation de tout fragment d'acide nucléique y compris des ARN anti-sens dans le but d'inhiber l'expression de la PDE4B e chez les patients atteints de telles pathologies,

15

- l'utilisation de tout composé chimique, notamment de la pentoxifylline, de l'étazolate, ou de toute composition pharmaceutique les contenant, dans le but d'inhiber l'activité de la PDE4B chez les patients atteints de telles pathologies,

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messenger de la PDE4B à des fins de caractérisation du tissu et de la situation ischémique.

20

REVENDEICATIONS

1. Méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure in vitro de l'expression de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B dans un échantillon provenant du sujet.
2. Méthode selon la revendication 1, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.
3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, comprenant la mise en contact in vitro d'un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de la PDE4B, et la détection de la formation d'un hybride.
4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'échantillon comprend des cellules nerveuses ou musculaires.
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour le diagnostic ou la détection de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington, de l'ALS ou de l'ischémie cérébrale.
6. Utilisation d'au moins un composé inhibant ou réduisant l'expression ou l'activité de la PDE4, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant.

8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique.

5 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines, en particulier l'étazolate, et les composés de la famille des dérivés de xanthine, en particulier la pentoxifylline.

10 10. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 9, pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives.

11. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 10, pour améliorer la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.

15

12. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 11, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.

20

13. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 11, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS.

14. Utilisation de la pentoxifylline pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.

25

15. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.

30

16. Utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.

17. Amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides
5 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou d'une séquence complémentaire de celles-ci.

18. Kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit
10 comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région 3' non-codante et une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région codante.

19. Kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression
15 différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4 et un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région codante de la PDE4.

20

Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par PCR semi-quantitative

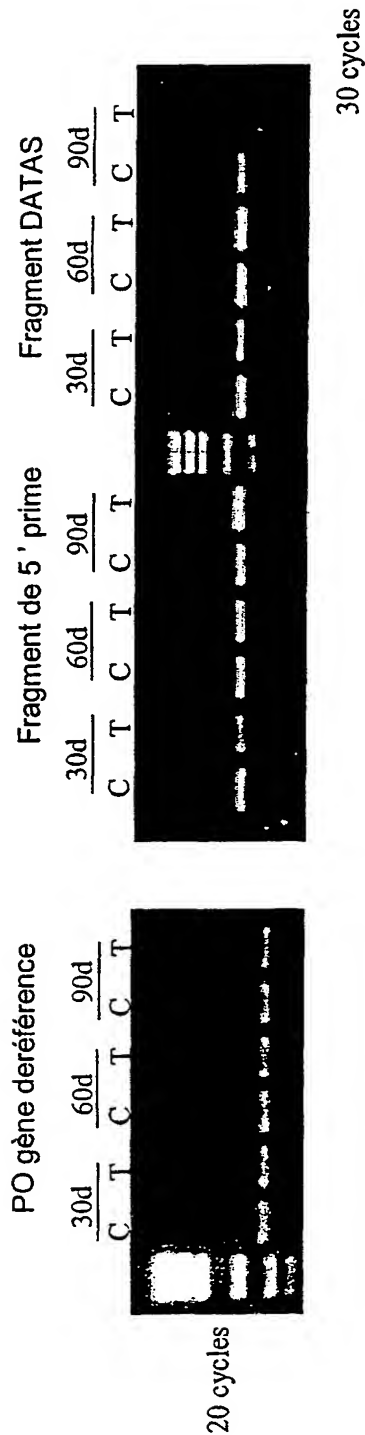
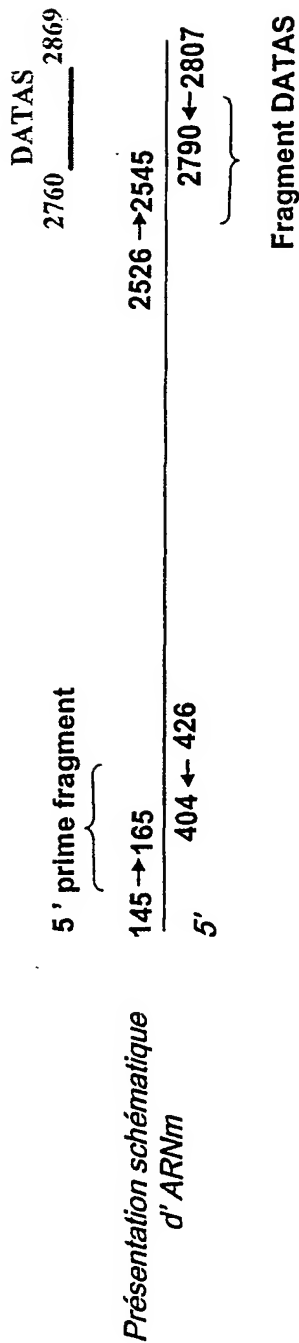


Figure 1A

MUSCLE

PDE4B (5')
145→165
404←426

2526→2545

2760→2869

DATAS

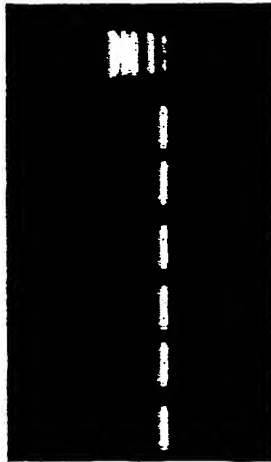
2790←2807

PDE4B (DATAS)

2/12

PO

30d 60d 90d
C T C T C T



20 cycles

PDE4B (5') PDE4B (DATAS)

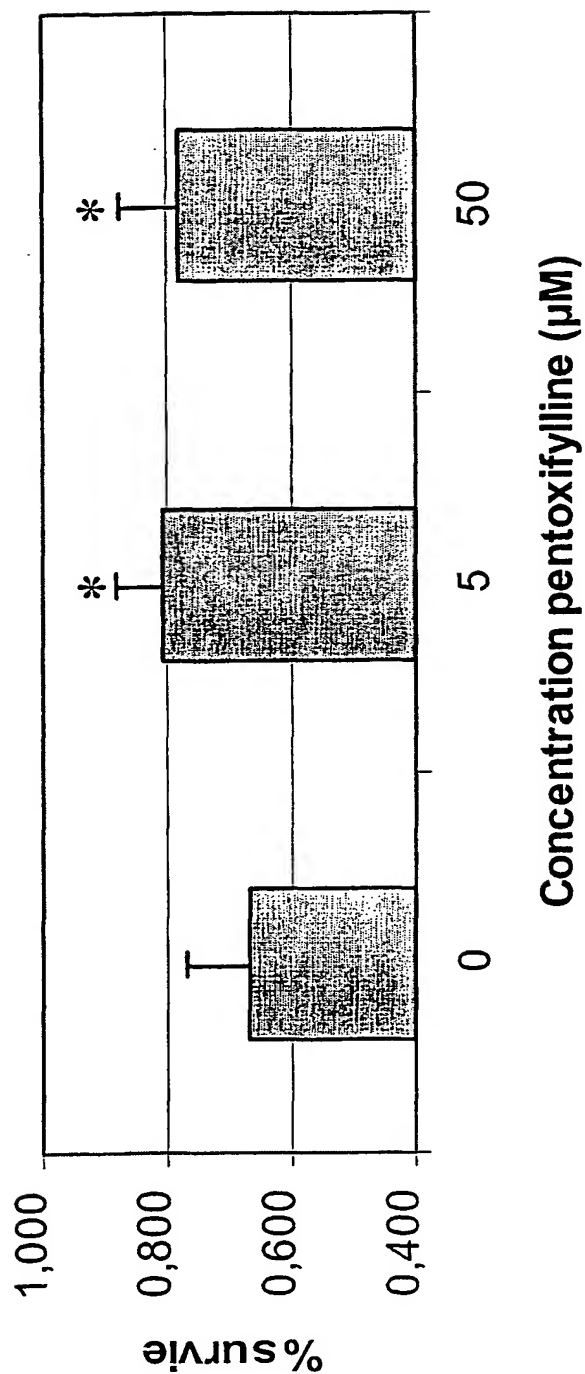
30d 60d 90d 30d 60d 90d
C T C T C T C T C T C T



25 cycles

Figure1B

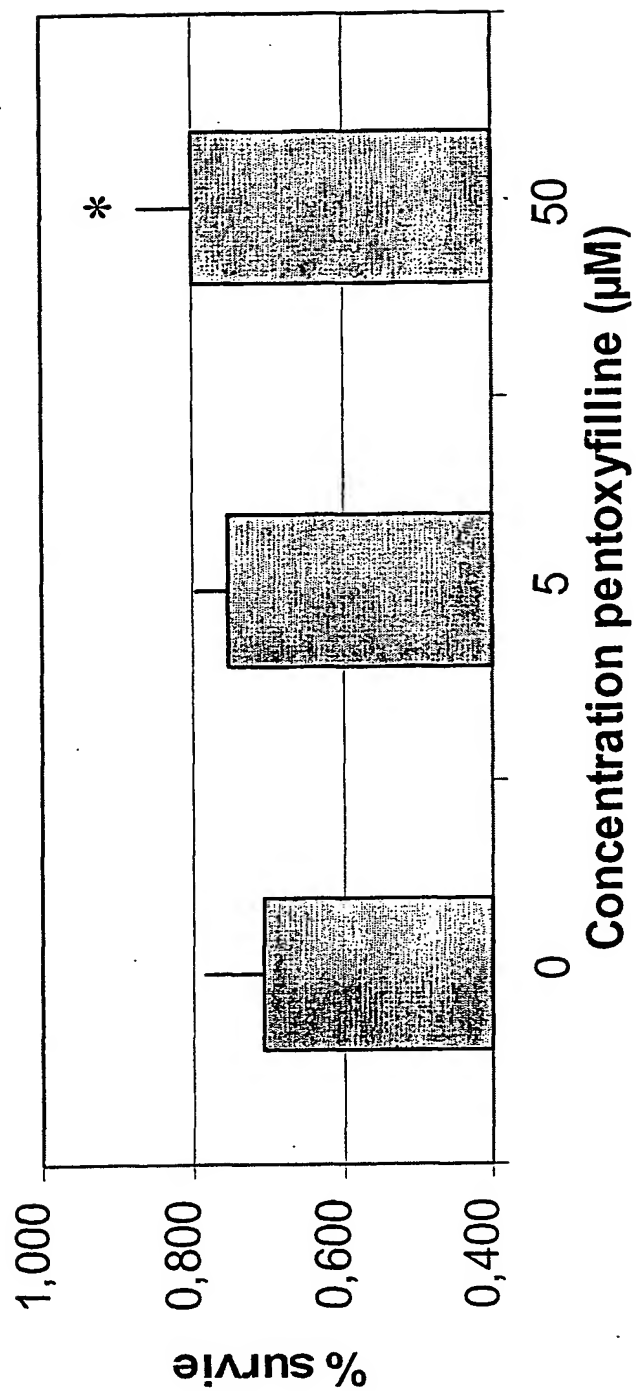
3/12



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 2

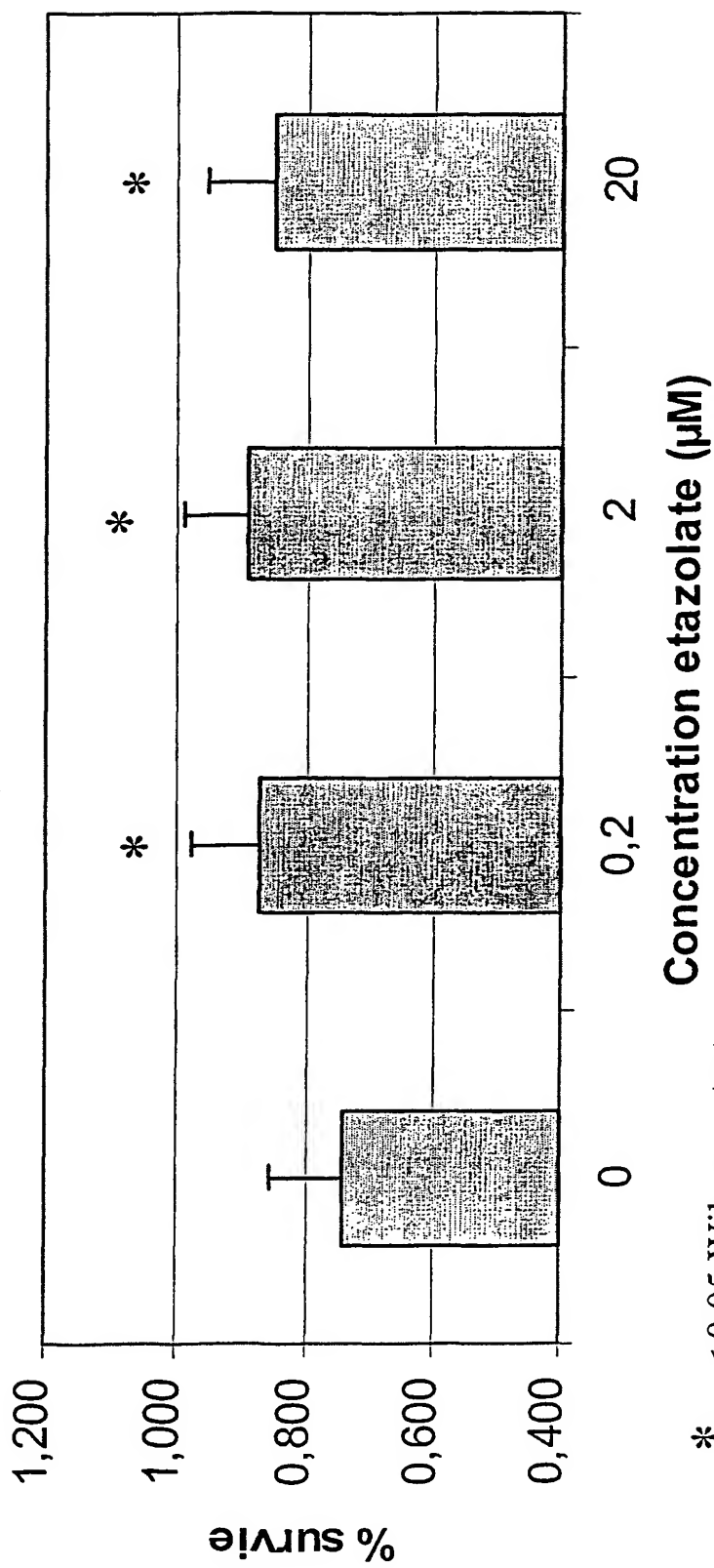
4/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 3

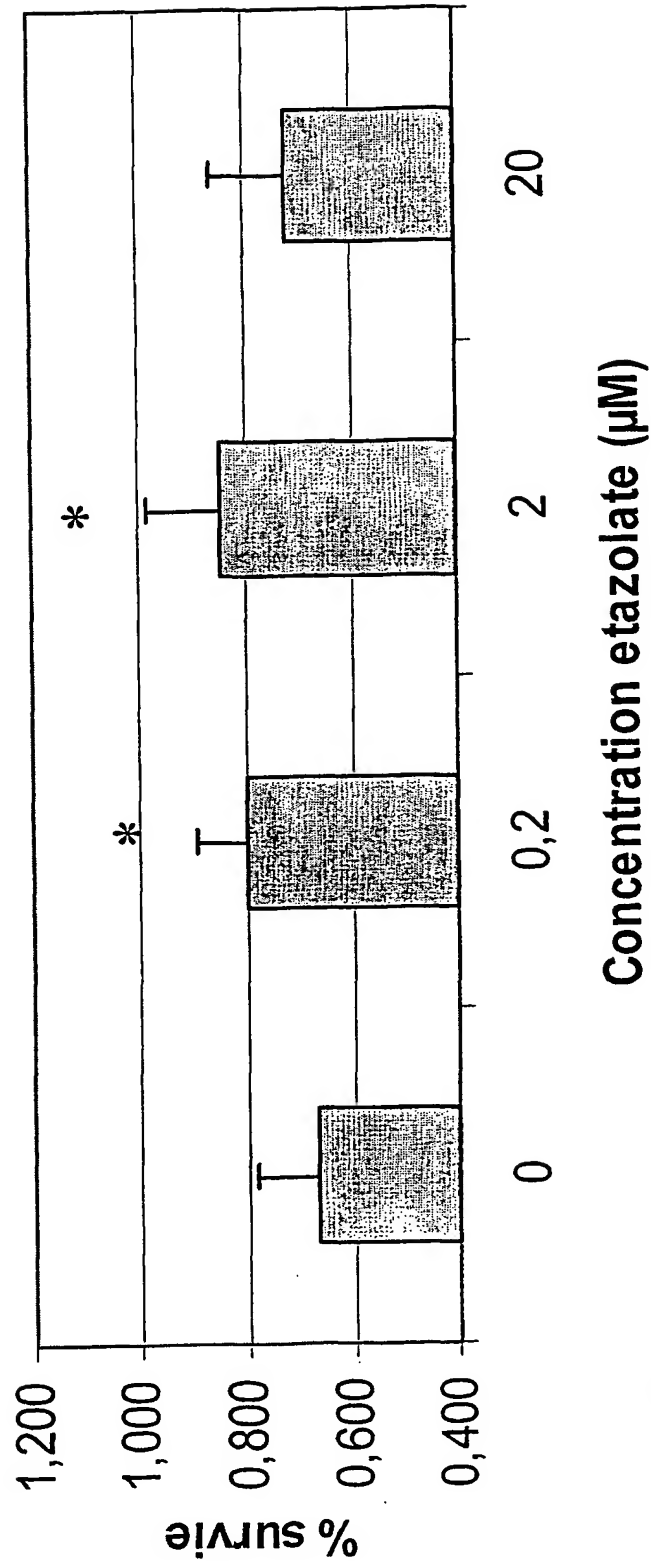
5/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 4

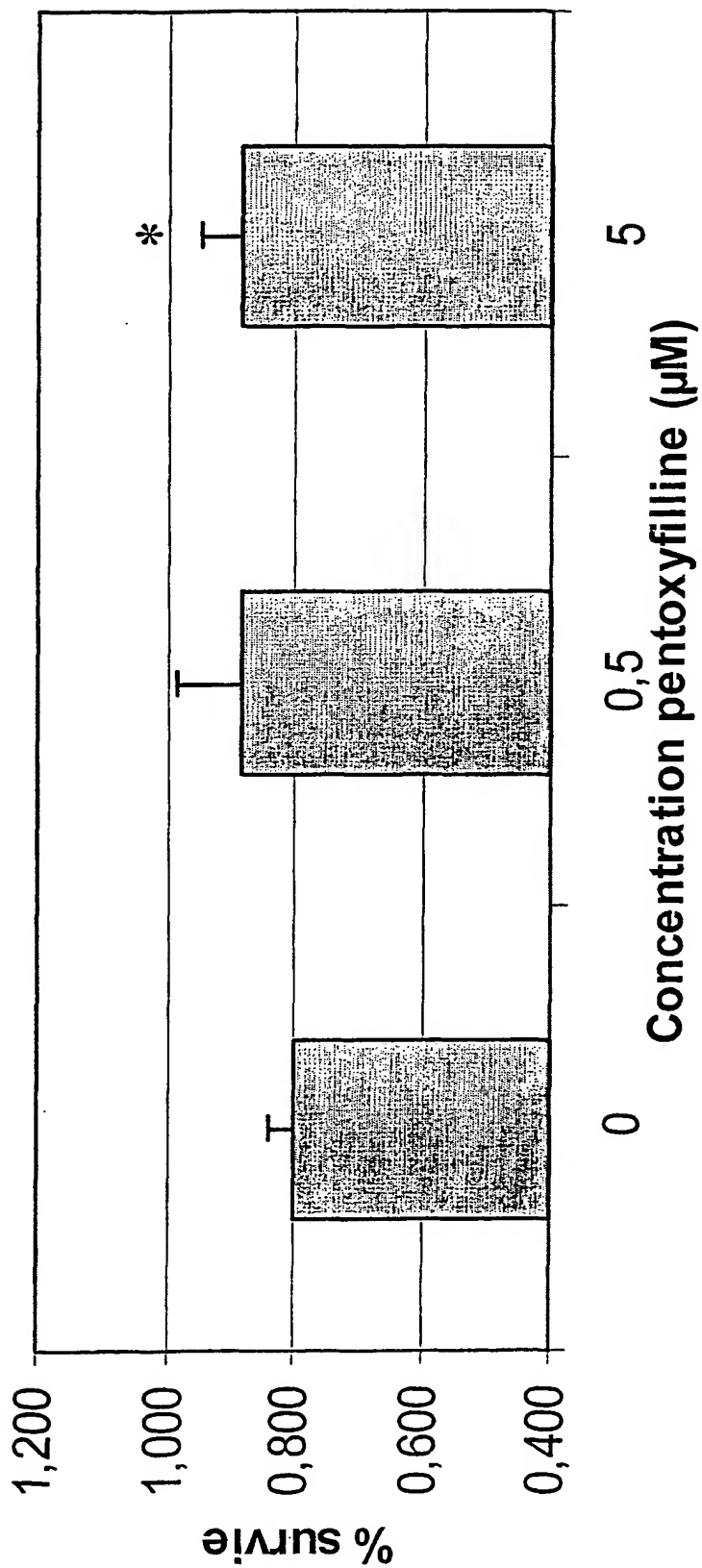
6/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 5

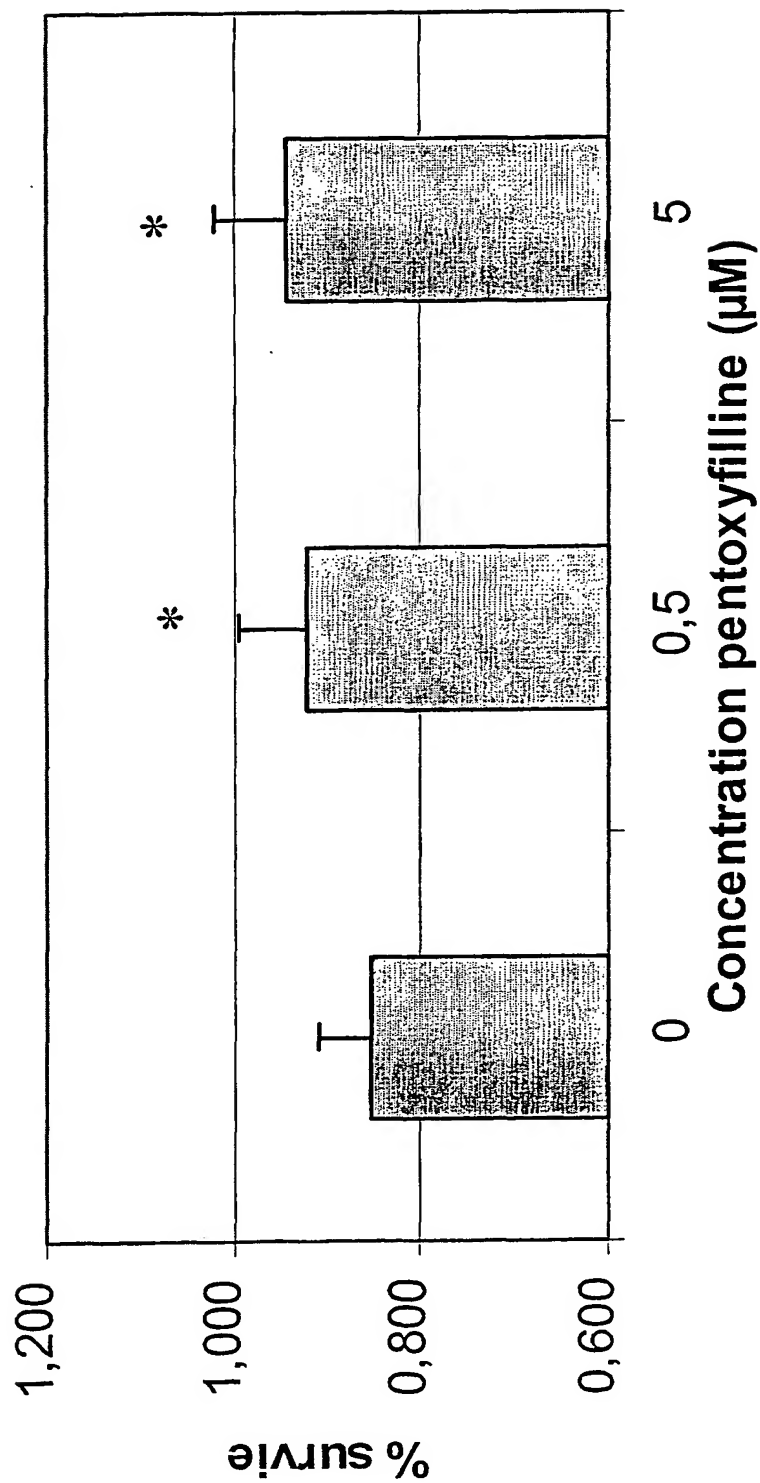
7/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

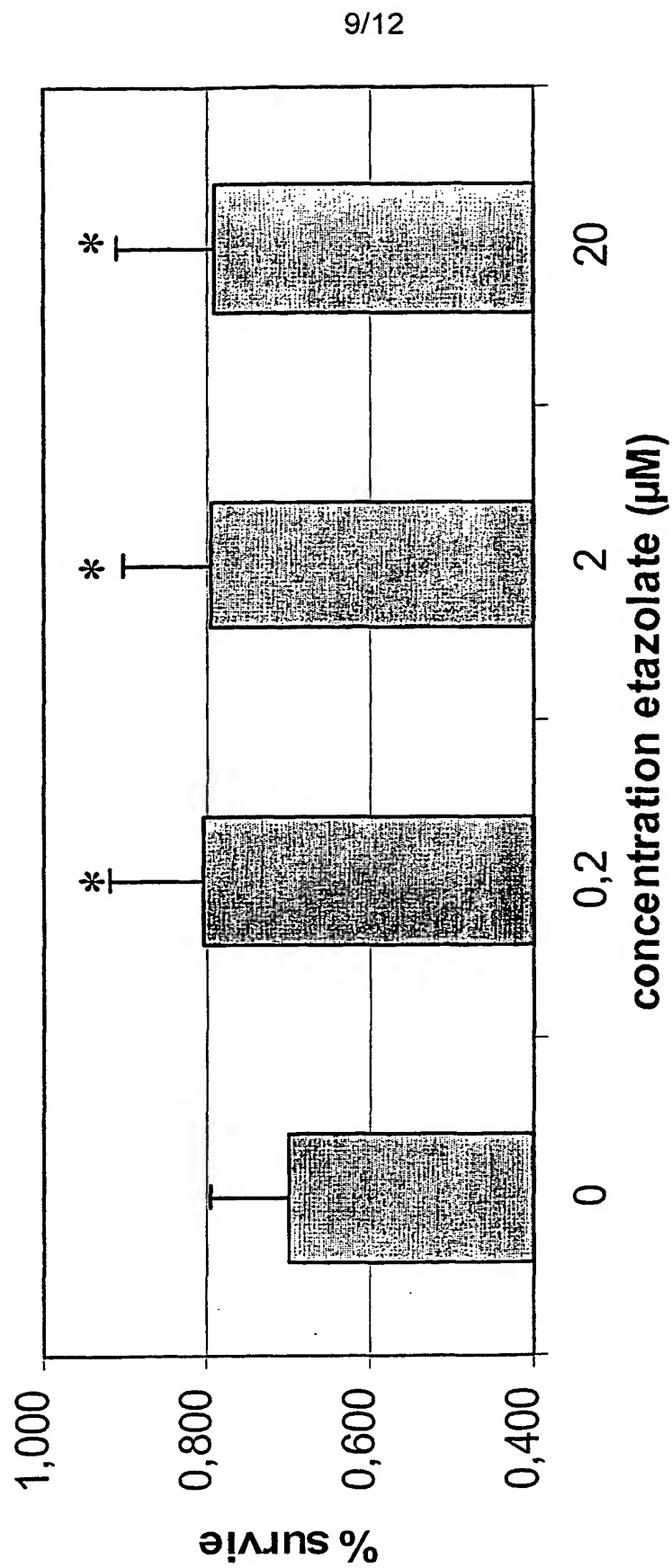
Figure 6

8/12



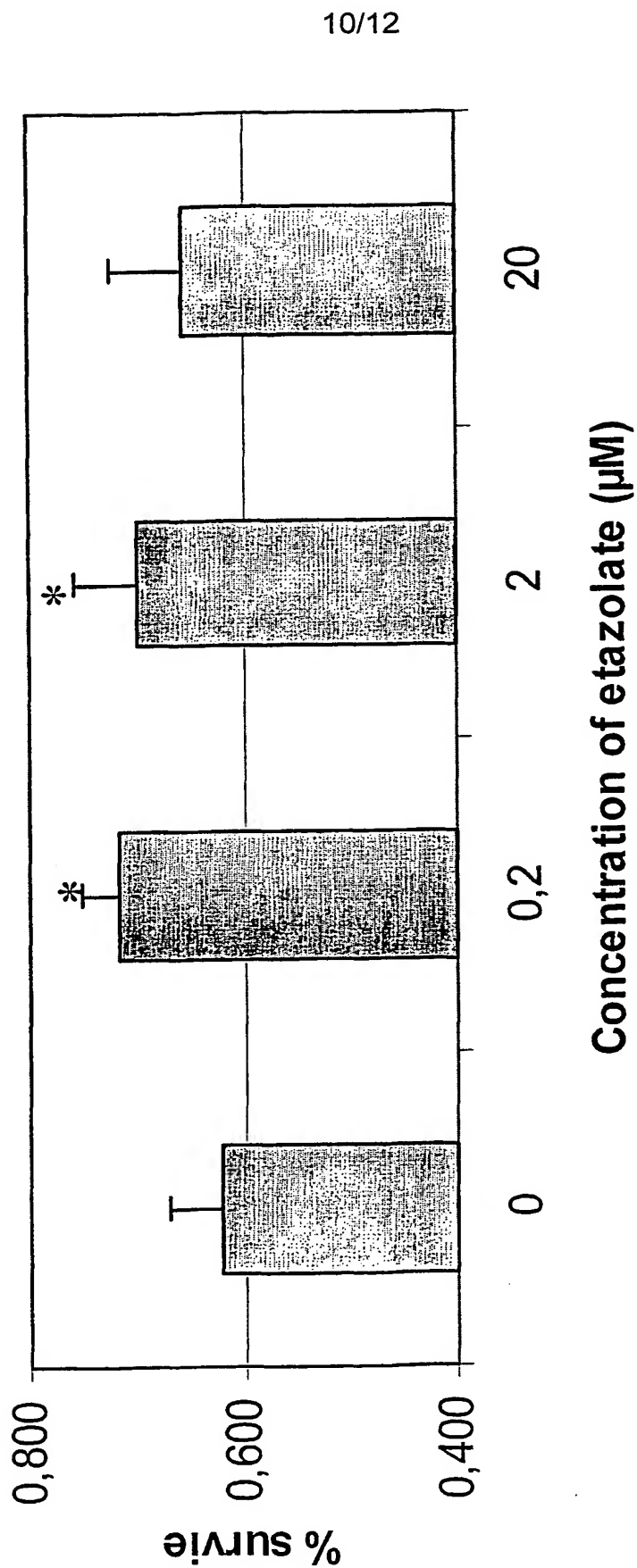
*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 7



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

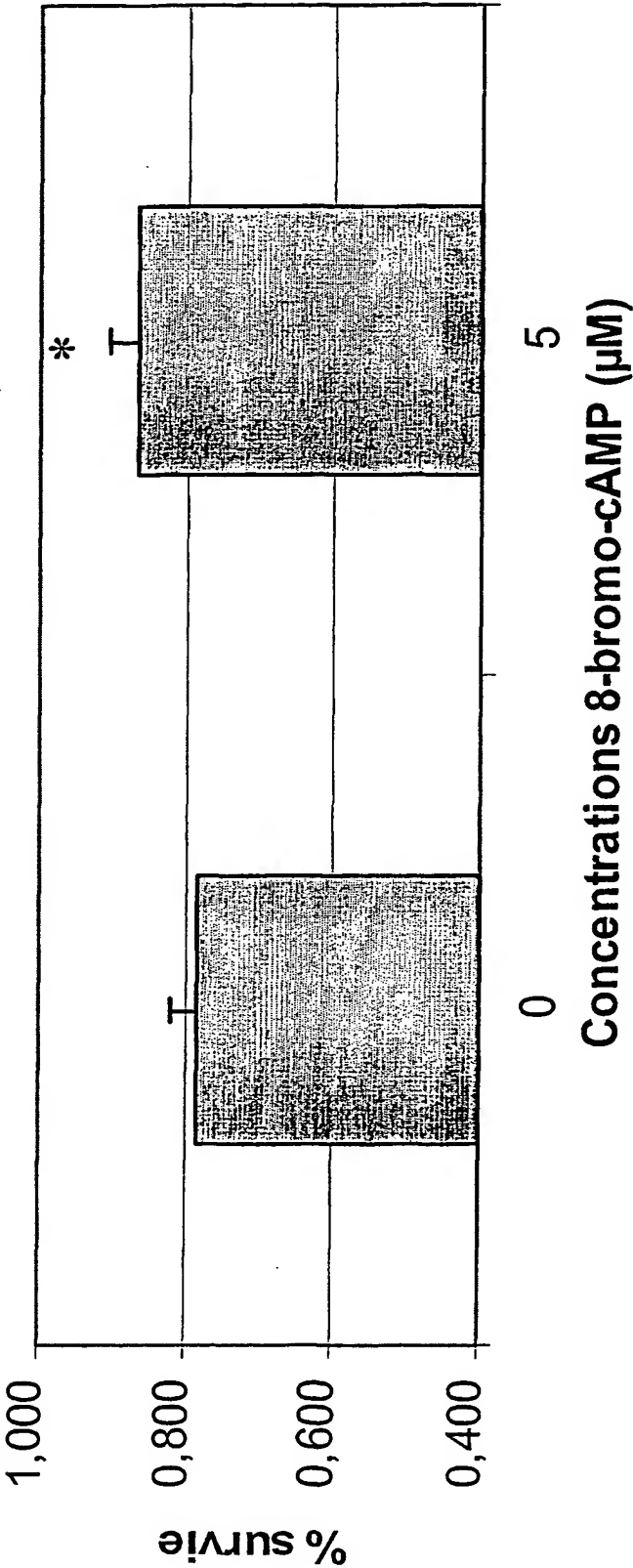
Figure 8



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 9

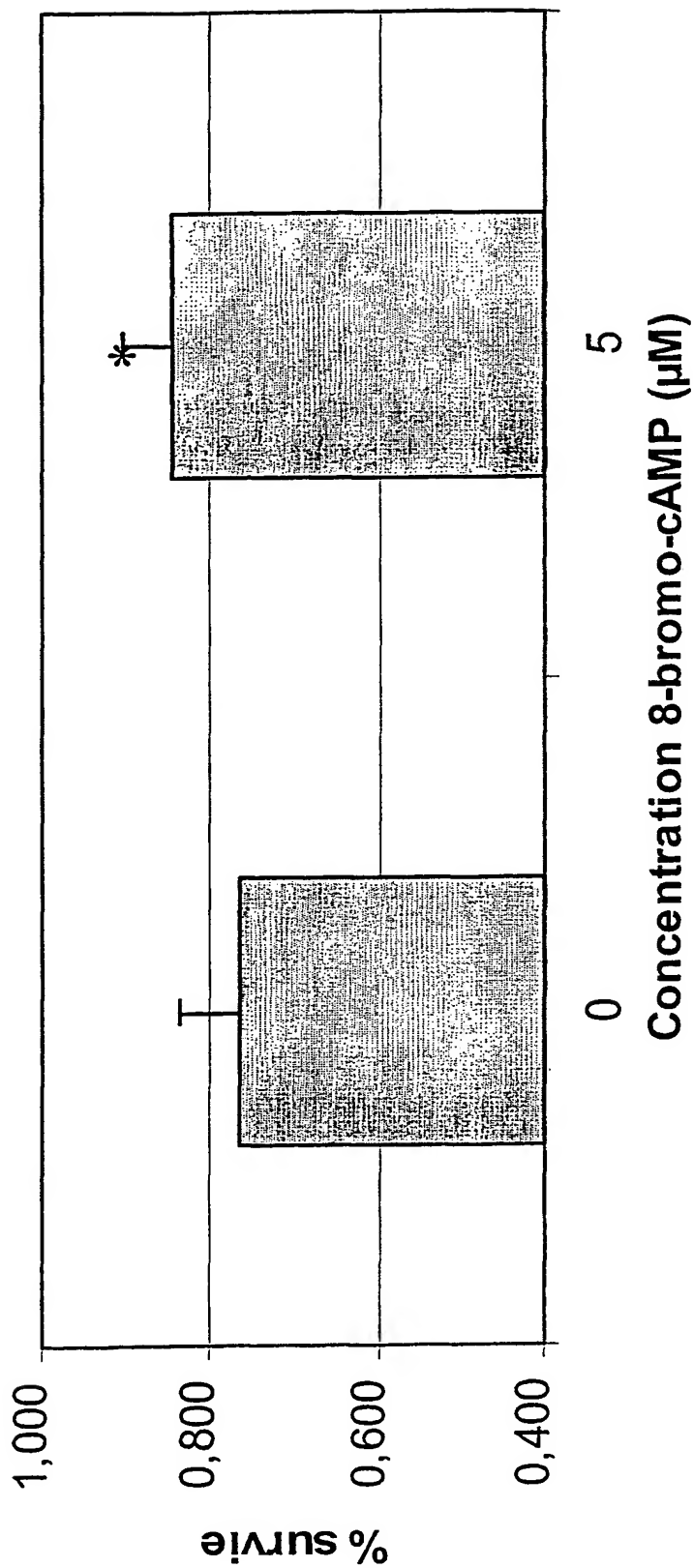
11/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 10

12/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 11

LISTE DE SEQUENCES

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Nouvelle cible moleculaire de la Neurotoxicité

<130> B0100WO

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2912

<212> ADN

<213> souris

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(2383)

<400> 1

aaaggcagcc tgataaagct ccttgtgaca ggctgtcttg ccagtctccc agtatgctcc 60

tcttgcctctg aagtgtcca ggattgaaac cacagcttcc caaattagcc tgggaagagt 120

gtgcggaccc agcagccttt taaccgcgct cagtgccttt gctatgttca agactgctgt 180

tttggatggt gaatgctagc tagcactcca tcgagac atg aca gca aaa aat tct 235

Met Thr Ala Lys Asn Ser

1

5

cca aaa gaa ttt act gct tcg gaa tct gag gtt tgc ata aag act ttc 283

Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu Val Cys Ile Lys Thr Phe

10

15

20

aag gag cag atg cgc ttg gaa ctt gag ctt cca aag cta cca gga aac 331

Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu Pro Lys Leu Pro Gly Asn

25

30

35

aga cct aca tct ccc aaa att tct cca cgc agt tca cca agg aat tca 379

Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg Ser Ser Pro Arg Asn Ser

40

45

50

cca tgc ttt ttc aga aag ttg ctg gtg aat aaa agc atc cga cag cg 427

Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg	
55 60 65 70	
cgt cgc ttc acg gtg gct cat aca tgc ttt gat gtg gaa aat ggc cct	475
Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe Asp Val Glu Asn Gly Pro	
75 80 85	
tct cca ggt cgg agc cca ctg gac cct caa gcc ggc tct tcg tcg gga	523
Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln Ala Gly Ser Ser Ser Gly	
90 95 100	
ctg gta ctt cat gcc gcc ttt cct ggg cac agc cag cgc agg gag tcg	571
Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His Ser Gln Arg Arg Glu Ser	
105 110 115	
ttc ctc tac gat ctt gac agc gac tat gac ttg tca cca aaa gcg atg	619
Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp Leu Ser Pro Lys Ala Met	
120 125 130	
tcc agg aac tca tca ctt ccc agt gag caa cac ggc gat gac ctg att	667
Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln His Gly Asp Asp Leu Ile	
135 140 145 150	
gtc act cct ttt gcc cag gtt ctt gcc agc ttg cga agt gta aga aac	715
Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser Leu Arg Ser Val Arg Asn	
155 160 165	
aac ttc acc ctg ctg acg aac ctt cat gga gcg ccg aac aag agg tca	763
Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly Ala Pro Asn Lys Arg Ser	
170 175 180	
cca gcg gct agt cag gct cca gtc tcc aga gtc agc ctg caa gag gaa	811
Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg Val Ser Leu Gln Glu Glu	
185 190 195	
tca tat cag aaa cta gca atg gag acg ctg gag gaa cta gac tgg tgc	859
Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys	
200 205 210	
cta gac cag cta gag acc atc cag acc tac cgc tct gtc agc gag atg	907
Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met	
215 220 225 230	
gct tca aac aag ttc aaa agg atg ctg aac cgg gag ctg aca cac ctc	955
Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu	
235 240 245	
tca gag atg agc aga tca ggg aac cag gtg tct gag tac att tca aac	1003

Ser Glu Met	Ser Arg	Ser Gly	Asn Gln	Val Ser	Glu Tyr	Ile Ser	Asn	
250			255			260		
acg ttc tta gac aag cag aac gat gtg gaa atc cca tct ccc acg cag	1051							
Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln								
265		270		275				
aag gac agg gag aag aag aag aag cag cag ctc atg acc cag ata agt	1099							
Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser								
280		285		290				
gga gtg aag aaa ctg atg cac agc tca agc ctg aac aac aca agc atc	1147							
Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile								
295		300		305		310		
tca cgc ttc ggg atc aac acg gaa aat gag gat cat cta gcc aag gag	1195							
Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu								
		315		320		325		
ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggc ctt aac atc ttc aat gtg gct ggg	1243							
Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly								
		330		335		340		
tac tca cat aat cgg ccc ctt acg tgc atc atg tat gca ata ttc cag	1291							
Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln								
		345		350		355		
gaa aga gac ctt ctg aag acg ttt aaa atc tca tct gac acc ttt gta	1339							
Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ser Asp Thr Phe Val								
		360		365		370		
acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat tct gat gtg gca tat	1387							
Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr								
		375		380		385		390
cac aac agc ctg cat gct gct gac gtg gcc cag tca act cac gtt ctc	1435							
His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu								
		395		400		405		
ctt tct acg ccg gca ctg gat gct gtc ttc aca gac ctg gaa atc ctg	1483							
Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu								
		410		415		420		
gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gat gtc gat cat cct gga gtc	1531							
Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val								
		425		430		435		
tcc aat cag ttt ctc atc aat aca aat tct gaa ctt gct ttg atg tat	1579							

Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr	
440 445 450	
aat gat gaa tct gtt ctg gaa aac cat cac ctt gct gtg gga ttc aaa	1627
Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys	
455 460 465 470	
ttg cta caa gag gaa cac tgc gac atc ttt cag aat ctt acc aag aag	1675
Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Gln Asn Leu Thr Lys Lys	
475 480 485	
caa cgc cag aca ctc agg aaa atg gtg att gac atg gtg ttg gca act	1723
Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr	
490 495 500	
gat atg tcc aaa cac atg agc ctc ctg gca gac ctt aaa aca atg gta	1771
Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val	
505 510 515	
gaa acc aag aag gtg aca agc tcc ggt gtt ctc ctc ctg gac aac tat	1819
Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr	
520 525 530	
act gac cgg ata cag gtt ctt cgc aac atg gta cac tgt gca gac ctg	1867
Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu	
535 540 545 550	
agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg caa tgg acc gat cgt	1915
Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg	
555 560 565	
atc atg gag gag ttt ttc cag cag gga gac aaa gaa cgg gag agg gga	1963
Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly	
570 575 580	
atg gag att agc cca atg tgt gat aag cac aca gct tct gtg gaa aaa	2011
Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys	
585 590 595	
tcc cag gtt ggt ttc att gac tac att gtc cat cca ctg tgg gag acc	2059
Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr	
600 605 610	
tgg gca gac ctg gtt caa ccg gat gct caa gat att ctg gat aca cta	2107
Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu	
615 620 625 630	
gaa gat aac agg aac tgg tac cag agt atg ata ccc cag agc cct tcc	2155

```

Glu Asp Asn Arg Asn Trp .Tyr Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser
      635                      640                      645

ccg cca ctg gat gag agg agc agg gac tgc caa ggc ctg atg gag aag 2203
Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys
      650                      655                      660

ttt cag ttt gaa ctg acc ctt gag gaa gag gat tct gag gga ccg gaa 2251
Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu
      665                      670                      675

aag gag gga gaa ggc cac agc tat ttc agc agc aca aag acg ctt tgt 2299
Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys
      680                      685                      690

gtg att gat cca gag aac agg gat tct ctg gaa gag act gac ata gac 2347
Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Glu Glu Thr Asp Ile Asp
      695                      700                      705                      710

att gca aca gaa gac aag tct ccg atc gac aca taa tctctctccc 2393
Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp Thr
      715                      720

tctgtgtgga gatgaacatt ccacccttga ctgagcatgc ccgctgagtg gtaggggtcac 2453

ctaccatggc caaggcctgc acaggacaaa ggccacctgg cctttccagt tacttgagtt 2513

tgagagccaga atgccaggcc gtgaagcaaa tagcagttcc atgctgtctt gccttgccctg 2573

caagcttggc ggagacccgc agctgtatgt ggtagtagag gccagttccc atcaaagcta 2633

aaatggcttg aaaacagagg acacaaagct gagagattgc tctgcactag gtgttgggaa 2693

gctgtcctga cagatgactg aactcactaa caacttcac tataaatctc accacccaac 2753

ccattgtctg ccaacctgtg tgcctttttt tgtaaaatgt tttcgcgtct ttgaaatgcc 2813

tgttgaatat ctagagttaa gtaccaactt ctacaaactt ttttgagtct ttcttgaaaa 2873

acaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2912

<210> 2
<211> 721
<212> PRT
<213> souris

<400> 2

```

```

Met Thr Ala Lys Asn Ser Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu
  1              5              10              15
Val Cys Ile Lys Thr Phe Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu
      20              25              30
Pro Lys Leu Pro Gly Asn Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg
      35              40              45
Ser Ser Pro Arg Asn Ser Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn
      50              55              60
Lys Ser Ile Arg Gln Arg Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe
      65              70              75              80
Asp Val Glu Asn Gly Pro Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln
      85              90              95
Ala Gly Ser Ser Ser Gly Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His
      100              105              110
Ser Gln Arg Arg Glu Ser Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp
      115              120              125
Leu Ser Pro Lys Ala Met Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln
      130              135              140
His Gly Asp Asp Leu Ile Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser
      145              150              155              160
Leu Arg Ser Val Arg Asn Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly
      165              170              175
Ala Pro Asn Lys Arg Ser Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg
      180              185              190
Val Ser Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu
      195              200              205
Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr
      210              215              220
Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn
      225              230              235              240
Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val
      245              250              255
Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu
      260              265              270
Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln
      275              280              285
Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser
      290              295              300
Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu
      305              310              315              320
Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn
      325              330              335
Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile
      340              345              350
Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile
      355              360              365
Ser Ser Asp Thr Phe Val Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr
      370              375              380

```

His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala
 385 390 395 400
 Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe
 405 410 415
 Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp
 420 425 430
 Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser
 435 440 445
 Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His
 450 455 460
 Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe
 465 470 475 480
 Gln Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile
 485 490 495
 Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala
 500 505 510
 Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val
 515 520 525
 Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met
 530 535 540
 Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr
 545 550 555 560
 Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp
 565 570 575
 Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His
 580 585 590
 Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val
 595 600 605
 His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln
 610 615 620
 Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met
 625 630 635 640
 Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys
 645 650 655
 Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu
 660 665 670
 Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser
 675 680 685
 Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu
 690 695 700
 Glu Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp
 705 710 715 720
 Thr

<210> 3

<211> 4068

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (766) .. (2460)

<223> PDE4B

<400> 3

gaattcctcc tctcttcacc ccgttagctg ttttcaatgt aatgctgccg tccttctctt 60
 gcactgcctt ctgcgctaac acctccattc ctgtttataa ccgtgtattt attacttaat 120
 gtatataatg taatgttttg taagttatta atttatatat ctaacattgc ctgccaatgg 180
 tgggtgttaa tttgtgtaga aaactctgcc taagagttac gactttttct tgtaatgttt 240
 tgtattgtgt attatataac ccaaactgca cttagtagag acatatggcc cccttggcag 300
 agaggacagg ggtgggcttt tgttcaaagg gtctgccctt tccttgctg agttgctact 360
 tctgcacaac ccctttatga accagttttc acccgaattt tgactgtttc atttagaaga 420
 aaagcaaat gagaaaaagc tttcctcatt tctccttgag atggcaaagc actcagaaat 480
 gacatcacat accctaaaga accctgggat gactaaggca gagagagtct gagaaaactc 540
 tttggtgctt ctgccttttag ttttaggaca catatatgca gatgagctta taagagaccg 600
 ttcctctcgc cttcttctc agaggaagtt tcttggtaga tcaccgacac ctcacccagg 660
 cgggggggtg gggggaaact tggcaccagc catcccaggc agagcaccac tgtgatttgt 720
 tctcctggtg gagagagctg gaaggaagga gccagcgtgc aaata atg aag gag cac 777
 Met Lys Glu His

1

ggg ggc acc ttc agt agc acc gga atc agc ggt ggt agc ggt gac tct 825
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ser
 5 10 15 20

gct atg gac agc ctg cag ccg ctc cag cct aac tac atg cct gtg tgt 873
 Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr Met Pro Val Cys
 25 30 35

ttg ttt gca gaa gaa tct tat caa aaa tta gca atg gaa acg ctg gag 921
 Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu
 40 45 50

gaa tta gac tgg tgt tta gac cag cta gag acc ata cag acc tac cgg	969
Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg	
55 60 65	
tct gtc agt gag atg gct tct aac aag ttc aaa aga atg ctg aac cgg	1017
Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg	
70 75 80	
gag ctg aca cac ctc tca gag atg agc cga tca ggg aac cag gtg tct	1065
Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser	
85 90 95 100	
gaa tac att tca aat act ttc tta gac aag cag aat gat gtg gag atc	1113
Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile	
105 110 115	
cca tct cct acc cag aaa gac agg gag aaa aag aaa aag cag cag ctc	1161
Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln Leu	
120 125 130	
atg acc cag ata agt gga gtg aag aaa tta atg cat agt tca agc cta	1209
Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu	
135 140 145	
aac aat aca agc atc tca cgc ttt gga gtc aac act gaa aat gaa gat	1257
Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr Glu Asn Glu Asp	
150 155 160	
cac ctg gcc aag gag ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggt ctt aac atc	1305
His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile	
165 170 175 180	
ttt aat gtg gct gga tat tct cac aat aga ccc cta aca tgc atc atg	1353
Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met	
185 190 195	
tat gct ata ttc cag gaa aga gac ctc cta aag aca ttc aga atc tca	1401
Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Arg Ile Ser	
200 205 210	
tct gac aca ttt ata acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat	1449
Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His	
215 220 225	
tct gac gtg gca tat cac aac agc ctg cac gct gct gat gta gcc cag	1497
Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln	
230 235 240	

10

gct tct gtg gaa aaa tcc cag gtt ggt ttc atc gac tac att gtc cat 2121
 Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His
 440 445 450

cca ttg tgg gag aca tgg gca gat ttg gta cag cct gat gct cag gac 2169
 Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp
 455 460 465

att ctc gat acc tta gaa gat aac agg aac tgg tat cag agc atg ata 2217
 Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile
 470 475 480

cct caa agt ccc tca cca cca ctg gac gag cag aac agg gac tgc cag 2265
 Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn Arg Asp Cys Gln
 485 490 495 500

ggt ctg atg gag aag ttt cag ttt gaa ctg act ctc gat gag gaa gat 2313
 Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Asp Glu Glu Asp
 505 510 515

tct gaa gga cct gag aag gag gga gag gga cac agc tat ttc agc agc 2361
 Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser
 520 525 530

aca aag acg ctt tgt gtg att gat cca gaa aac aga gat tcc ctg gga 2409
 Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Gly
 535 540 545

gag act gac ata gac att gca aca gaa gac aag tcc ccc gtg gat aca 2457
 Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Val Asp Thr
 550 555 560

taa tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag 2510
 565

ctatgtggta gggccagccc accatggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg 2570

gcctttcagt tacttgagtt tggagtcaga aagcaagacc aggaagcaaa tagcagctca 2630

ggaaatccca cggttgactt gccttgatgg caagcttggt ggagagggct gaagctgttg 2690

ctggggggccg attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga 2750

tcattctgca ctaagtttcg ggaacttatc cccgacagtg actgaactca ctgactaata 2810

acttcattta tgaatcttct cacttgtecc tttgtctgcc aacctgtgtg ccttttttgt 2870

aaaacatttt catgtcttta aaatgcctgt tgaatacctg gagtttagta tcaacttcta 2930
 cacagataag ctttcaaagt tgacaaactt ttttgactct ttctggaaaa gggaaagaaa 2990
 atagtcttcc ttctttcttg ggcaatatcc ttcactttac tacagttact tttgcaaaca 3050
 gacagaaagg atacacttct aaccacattt tacttccttc ccctgttgtc cagtccaact 3110
 ccacagtcac tcttaaaact tctctctggt tgccctgcctc caacagtact ttttaactttt 3170
 tgctgtaaac agaataaaat tgaacaaatt agggggtaga aaggagcagt ggtgtcgttc 3230
 accgtgagag tctgcataga actcagcagt gtgccctgct gtgtcttgga ccctgcccc 3290
 cacaggagtt gctacagtcc ctggccctgc ttcccatcct cctctcttca ccccgtttagc 3350
 tgttttcaat gtaatgctgc cgtccttctc ttgcaactgcc ttctgcgcta acacctccat 3410
 tctgttttat aaccgtgtat ttattactta atgtatataa tgtaatgttt tgtaagttat 3470
 taatttatat atctaacatt gectgccaat ggtggtgtta aatttgtgta gaaaactctg 3530
 cctaagagtt acgacttttt cttgtaatgt tttgtattgt gtattatata acccaaactg 3590
 cacttagtag agacatatgg ccccttggtc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaaa 3650
 ggggtctgcc ttccctgcc tgagttgcta cttctgcaca acccctttat gaaccagttt 3710
 tggaaacaat attctcacat tagatactaa atggtttata ctgagtcttt tacttttgta 3770
 tagcttgata ggggcagggg caatgggatg tagtttttac ccaggttcta tccaaatcta 3830
 tgtgggcatg agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttg gttcaaaagg 3890
 aaacactaca tttgctcaca gatgattctt ctgattcttc tgaatgctcc cgaactactg 3950
 actttgaaga ggtagcctcc tgccctgccat taagcaggaa tgtcatgttc cagttcatta 4010
 caaaagaaaa caataaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattc 4068

<210> 4

<211> 564

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Glu His Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Ser Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr
 20 25 30
 Met Pro Val Cys Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met
 35 40 45
 Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile
 50 55 60
 Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg
 65 70 75 80
 Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly
 85 90 95
 Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn
 100 105 110
 Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys
 115 120 125
 Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His
 130 135 140
 Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr
 145 150 155 160
 Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp
 165 170 175
 Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu
 180 185 190
 Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr
 195 200 205
 Phe Arg Ile Ser Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu
 210 215 220
 Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp
 245 250 255
 Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala
 260 265 270
 Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn
 275 280 285
 Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu
 290 295 300
 Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys
 305 310 315 320
 Asp Ile Phe Met Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys
 325 330 335
 Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser
 340 345 350
 Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser
 355 360 365
 Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu
 370 375 380

Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys
 420 425 430
 Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp
 435 440 445
 Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro
 450 455 460
 Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr
 465 470 475 480
 Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn
 485 490 495
 Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu
 500 505 510
 Asp Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser
 515 520 525
 Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg
 530 535 540
 Asp Ser Leu Gly Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser
 545 550 555 560
 Pro Val Asp Thr

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 5

gccaggccgt gaagcaaata

20

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 6

tcaaagacgc gaaaacat

18

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 7
ccgcgtcagt gcctttgcta t 21

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 8
cgctgtcgga tgcttttatt cac 23

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 9
tcgctttctg gaggggtgc 19

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10
ccgcaggggc agcagtgg 18

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 février 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/016563 A3

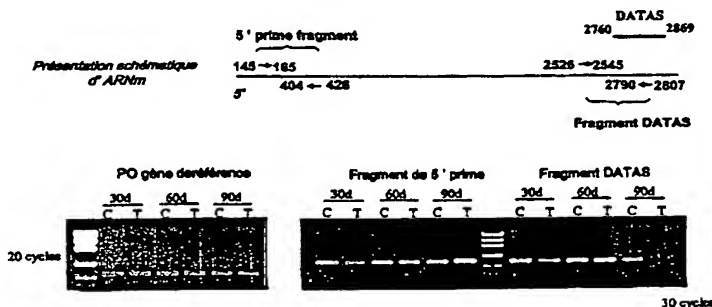
- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68, C12N 9/16
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2002/002861
- (22) Date de dépôt international : 13 août 2002 (13.08.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
01/10819 14 août 2001 (14.08.2001) FR
- (63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continuation partielle (CIP) à une demande antérieure :
US 09/983,754 (CIP)
Déposée le Non communiquée
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EX-ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel, F-75017 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AÏT IKHLEF, Ali [FR/FR]; 1, rue de l'Eglise, 91940 Gometz Le Châtel (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR).
- (74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: NOVEL MOLECULAR TARGET FOR NEUROTOXICITY

(54) Titre : CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par
PCR semi-quantitative



A

ANALYSE...:-ANALYSIS OF EXPRESSION OF PDE4B ISOFORMS IN THE
BRAIN BY SEMI-QUANTITATIVE PCR
PRÉSENTATION SCHEMATIQUE...:- SCHEMATIC ARNM REPRESENTATION
PO GÈNE...:- PO REFERENCE GENE
FRAGMENT DE 5' PRIME...:- 5' PRIME FRAGMENT
FRAGMENT DATAS...:- DATAS FRAGMENT
RESTE IDEM

(57) Abstract: The invention relates to the field of biology, genetics and medicine and to novel methods of detecting, characterising and/or treating (or managing) neurodegenerative pathologies, particularly amyotrophic lateral sclerosis. Said invention also relates to methods of identifying or screening active compounds in said pathologies. Moreover, the invention relates to compounds, genes, cells, plasmids or compositions that can be used to carry out the above-mentioned methods. In particular, the invention outlines the role of PDE4B in said pathologies and the use thereof as a therapeutic, diagnostic or experimental target.

[Suite sur la page suivante]

WO 2003/016563 A3



SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

1 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de PDE4B dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EPO-Internal, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
*X	CHERRY J A ET AL: "Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1518, no. 1-2, 19 March 2001 (2001-03-19), pages 27-35, XP004275852 ISSN: 0167-4781 page 27 -page 28, left-hand column; figures 1,3,4; table 1 & DATABASE EMBL 'Online! ebi; 23 December 1999 (1999-12-23) XP002248838 abstract --- -/--	1,6,8,17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2003

Date of mailing of the international search report

31/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02861

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 977 305 A (COLICELLI JOHN J ET AL) 2 November 1999 (1999-11-02) SEQ ID NOs: 23,24 & 58 column 3, line 41 -column 6, line 3 column 7, line 40 -column 9, line 35 column 10, line 38 -column 11, line 21 examples 5,11 ---	1-6,8, 18,19
X	WO 00 40714 A (ARROW AMY ;OLIGOS ETC INC (US); THOMPSON TERRY (US); DALE RODERIC) 13 July 2000 (2000-07-13) page 1, line 1 -page 4, line 25; claims 1-11 ---	6-8
X	MISHRA S K ET AL: "CALCIUM CALMODULIN AND 3' 5' CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCULAR DISORDERS" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 109, no. 2, June 1992 (1992-06), pages 215-218, XP001064869 ISSN: 0022-510X abstract; table 1 ---	1
A	US 5 851 784 A (PERRY MARTIN JOHN ET AL) 22 December 1998 (1998-12-22) column 1, line 16 -column 6, line 13 ---	1-19
A	WO 01 44449 A (UNIV UTAH RES FOUND ;BOLGER GRAEME (US)) 21 June 2001 (2001-06-21) SEQ ID NO: 11 page 7, line 7 -page 8, line 24; claims 1-18; example 1 ---	1-19
A	US 6 060 501 A (GRAF HERMANN ET AL) 9 May 2000 (2000-05-09) column 4, line 29 - line 65 ---	1-19
A	PRICE D L ET AL: "AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE LESSONS FROM MODEL SYSTEMS" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 153, no. 8/9, September 1997 (1997-09), pages 484-495, XP000982876 ISSN: 0035-3787 abstract page 486 -page 488, left-hand column -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/02861

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5977305	A	02-11-1999	US 6100025 A	08-08-2000
			US 5527896 A	18-06-1996
			US 6080540 A	27-06-2000
			US 6069240 A	30-05-2000
			AT 204603 T	15-09-2001
			CA 2080920 A1	21-10-1991
			DE 69132701 D1	27-09-2001
			DE 69132701 T2	20-06-2002
			DK 666314 T3	10-12-2001
			EP 0537173 A1	21-04-1993
			EP 0666314 A1	09-08-1995
			EP 0940469 A2	08-09-1999
			ES 2165397 T3	16-03-2002
			HK 1013314 A1	10-05-2002
			JP 11253200 A	21-09-1999
			JP 3258635 B2	18-02-2002
			JP 11239481 A	07-09-1999
			JP 5507196 T	21-10-1993
			WO 9116457 A1	31-10-1991
			US 6569617 B1	27-05-2003
WO 0040714	A	13-07-2000	AU 2480800 A	24-07-2000
			CA 2357950 A1	13-07-2000
			EP 1141278 A2	10-10-2001
			JP 2002534086 T	15-10-2002
			US 2003045490 A1	06-03-2003
			WO 0040714 A2	13-07-2000
US 5851784	A	22-12-1998	AU 4270596 A	19-07-1996
			CA 2182946 A1	04-07-1996
			EP 0746619 A1	11-12-1996
			WO 9620281 A1	04-07-1996
			GB 2301363 A , B	04-12-1996
			JP 9509851 T	07-10-1997
			US 6291199 B1	18-09-2001
WO 0144449	A	21-06-2001	AU 2433001 A	25-06-2001
			WO 0144449 A1	21-06-2001
US 6060501	A	09-05-2000	AU 699085 B2	19-11-1998
			AU 2266295 A	16-11-1995
			CA 2188269 A1	02-11-1995
			EP 0758233 A1	19-02-1997
			WO 9528926 A1	02-11-1995
			JP 2001508020 T	19-06-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/02861

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/68 C12N9/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, Sequence Search, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHERRY J A ET AL: "Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1518, no. 1-2, 19 mars 2001 (2001-03-19), pages 27-35, XP004275852</p> <p>ISSN: 0167-4781</p> <p>page 27 - page 28, colonne de gauche; figures 1,3,4; tableau 1</p> <p>& DATABASE EMBL</p> <p>ebi; 23 décembre 1999 (1999-12-23), XP002248838</p> <p>abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,6,8,17

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 janvier 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31 07 2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

van Klompenburg, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/02861

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 977 305 A (COLICELLI JOHN J ET AL) 2 novembre 1999 (1999-11-02) SEQ ID NOs: 23,24 & 58 colonne 3, ligne 41 - colonne 6, ligne 3 colonne 7, ligne 40 - colonne 9, ligne 35 colonne 10, ligne 38 - colonne 11, ligne 21 exemples 5,11	1-6,8, 18,19
X	WO 00/40714 A (ARROW AMY ;OLIGOS ETC INC (US); THOMPSON TERRY (US); DALE RODERIC) 13 juillet 2000 (2000-07-13) page 1, ligne 1 - page 4, ligne 25; revendications 1-11	6-8
X	MISHRA S K ET AL: "CALCIUM CALMODULIN AND 3' 5' CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCULAR DISORDERS" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 109, no. 2, juin 1992 (1992-06), pages 215-218, XP001064869 ISSN: 0022-510X abrégé; tableau 1	1
A	US 5 851 784 A (PERRY MARTIN JOHN ET AL) 22 décembre 1998 (1998-12-22) colonne 1, ligne 16 - colonne 6, ligne 13	1-19
A	WO 01/044449 A (UNIV UTAH RES FOUND ;BOLGER GRAEME (US)) 21 juin 2001 (2001-06-21) SEQ ID NO: 11 page 7, ligne 7 - page 8, ligne 24; revendications 1-18; exemple 1	1-19
A	US 6 060 501 A (GRAF HERMANN ET AL) 9 mai 2000 (2000-05-09) colonne 4, ligne 29 - ligne 65	1-19
A	PRICE D L ET AL: "AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE LESSONS FROM MODEL SYSTEMS" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 153, no. 8/9, septembre 1997 (1997-09), pages 484-495, XP000982876 ISSN: 0035-3787 abrégé page 486 - page 488, colonne de gauche	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/02861

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5977305	A	02-11-1999	US 6100025 A	08-08-2000
			US 5527896 A	18-06-1996
			US 6080540 A	27-06-2000
			US 6069240 A	30-05-2000
			AT 204603 T	15-09-2001
			CA 2080920 A1	21-10-1991
			DE 69132701 D1	27-09-2001
			DE 69132701 T2	20-06-2002
			DK 666314 T3	10-12-2001
			EP 0537173 A1	21-04-1993
			EP 0666314 A1	09-08-1995
			EP 0940469 A2	08-09-1999
			ES 2165397 T3	16-03-2002
			HK 1013314 A1	10-05-2002
			JP 11253200 A	21-09-1999
			JP 3258635 B2	18-02-2002
			JP 11239481 A	07-09-1999
			JP 5507196 T	21-10-1993
			WO 9116457 A1	31-10-1991
			US 6569617 B1	27-05-2003
WO 0040714	A	13-07-2000	AU 2480800 A	24-07-2000
			CA 2357950 A1	13-07-2000
			EP 1141278 A2	10-10-2001
			JP 2002534086 T	15-10-2002
			US 2003045490 A1	06-03-2003
			WO 0040714 A2	13-07-2000
US 5851784	A	22-12-1998	AU 4270596 A	19-07-1996
			CA 2182946 A1	04-07-1996
			EP 0746619 A1	11-12-1996
			WO 9620281 A1	04-07-1996
			GB 2301363 A ,B	04-12-1996
			JP 9509851 T	07-10-1997
			US 6291199 B1	18-09-2001
WO 0144449	A	21-06-2001	AU 2433001 A	25-06-2001
			WO 0144449 A1	21-06-2001
US 6060501	A	09-05-2000	AT 255413 T	15-12-2003
			AU 699085 B2	19-11-1998
			AU 2266295 A	16-11-1995
			CA 2188269 A1	02-11-1995
			DE 69532238 D1	15-01-2004
			EP 1380291 A1	14-01-2004
			EP 0758233 A1	19-02-1997
			WO 9528926 A1	02-11-1995
			JP 2001508020 T	19-06-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.